

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-111454

(43)Date of publication of application : 16.05.1988

(51)Int.Cl.

G01N 27/30

(21)Application number : 61-258921

(71)Applicant : NEC CORP

(22)Date of filing : 29.10.1986

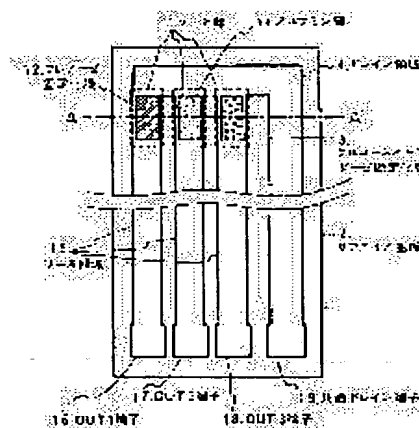
(72)Inventor : KAWANA YOSHIE  
KIMURA JUN

## (54) PRODUCTION OF IMMOBILIZED ENZYME FILM

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To exactly form a pattern of an enzyme-contg. soln. so that a crosslinking treatment can be made in that form by dropping the enzyme-contg. soln. to gate parts on a solid surface, then bringing the same into contact with vapor contg. a crosslinking reagent to insolubilize the soln.

**CONSTITUTION:** Three pieces of ion sensitive field effect type transistors are formed of silicon formed in an island shape on a sapphire substrate 2. Ureaze immobilized films 12, glucose oxidase immobilized films 13 and albumin films 14 are formed on the respective gate parts 1 by dropping of the solns. by an ink jet method. After the films are once dried, the substrate is placed on a supporting net in a hermetic vessel contg. an aq. glutaraldehyde soln. of 25% and is rested for about 5min to insolubilize the enzyme films.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-111454

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>  
G 01 N 27/30

識別記号 庁内整理番号  
J-7363-2G  
F-7363-2G

⑭ 公開 昭和63年(1988)5月16日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 固定化酵素膜の製造方法

⑯ 特 願 昭61-258921

⑰ 出 願 昭61(1986)10月29日

⑱ 発 明 者 川 名 美 江 東京都港区芝5丁目7番15号 日本電気環境エンジニアリング株式会社内  
⑲ 発 明 者 木 村 純 東京都港区芝5丁目33番1号 日本電気株式会社内  
⑳ 出 願 人 日本電気株式会社 東京都港区芝5丁目33番1号  
㉑ 代 理 人 弁理士 内 原 晋

明 細 書

発明の名称 固定化酵素膜の製造方法

特許請求の範囲

(1) 固体表面上の特定の位置に酵素含有溶液を形成した後、該溶液を架橋試薬を含む蒸気と接触させることを特徴とする固定化酵素膜の製造方法。

(2) 架橋試薬がグルタルアルデヒドである特許請求の範囲第1項記載の固定化酵素膜の製造方法。

発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明の固定化酵素膜の製造方法に関し、特に半導体バイオセンサにおける固定化酵素膜の製造方法に関する。

(従来の技術)

酵素を分析分野に応用する試みは古くから行われている。この中でも固定化酵素膜と各種電気化学デバイスを用いた酵素電極は迅速、簡便かつ高感度な分析手段である。近年、これらの酵素電極

の微小化の要望が高まり、中でもイオン感受性電界効果型トランジスタ(Ion Sensitive Field Effect Transistor, 以下ISFETと略す。)を用いた酵素電極はシリコンICの製造技術をそのまま利用してつくることができる点で注目されている。また絶縁基板上に微小な2本貴金属電極を同様のシリコンIC製造技術電極を同様のシリコンIC製造技術を用いて形成し、この表面に酵素膜を形成したバイオセンサも提案されている(特願昭59-134995)。

このような微小なセンサの感応部に酵素膜を形成する方法として本発明者らは、感応部以外の部分をあらかじめ疎水性樹脂で被膜した後、感応部に酵素含有液を保持させることによって固定化酵素膜を形成する方法を提案した(特願昭59-208626)。この方法は、酵素を含有する第1の液を感応部に滴下、乾燥させた後、架橋剤を含有する第2の液を同一部位に滴下、反応させて固定化酵素膜を得ていた。

(発明が解決しようとする問題点)

しかしながら、この方法では1ヶ所の酵素膜を形成するために2度の滴下操作が必要である。また、微細なパターンの場合には架橋剤を滴下する際に酵素含有液のパターンが崩れ酵素が流出することもあった。本発明の目的はより簡単にに微小な酵素膜を形成する方法を提供することである。

(問題を解決するための手段)

本発明によれば、固体上の酵素含有溶液を架橋試薬を含む蒸気と接触させることにより固定化酵素膜が得られる。

(作用)

このような手段をとることによって、酵素含有溶液のパターンが正確に形成できれば、そのままの形で架橋処理を行うことが可能である。

(実施例)

以下、この発明の実施例を図に基いて詳細に説明する。第2図はこの発明に係る製造方法の一実施例を説明するための酵素電極の構造を示す図であり、ISFETを用いたマルチバイオセンサに適用した場合を示す。第2図(a)は上面図(b)は(a)のA-A'にお

ける断面図である。サファイア基板2の上に島状に形成されたシリコンにより、3個のISFETが形成されている。1は、ISFETのゲート部で窒化シリコンで被覆されH<sup>+</sup>イオン感應部である。15は各ISFETのソース領域、4はドレイン領域でドレイン領域は共通になっている。また16, 17, 18はOUT端子、19は共通ドレイン端子である。それぞれのゲート部にはウレアーゼ固定化膜12、グルコースオキシターゼ固定化膜13、アルブミン膜14が形成されている。サファイア基板の裏面には金3が蒸着されており、この金を疑似参照電極としてウレアーゼ固定化膜を持つISFETとアルブミン膜を持つISFETの差動で尿素が検出され、グルコースオキシターゼ固定化膜とアルブミン膜を持つISFETと差動でグルコースが検出される。

第2図に示した酵素電極は幅2mm長さ6mmでの微小なチップであり、この上に三種類の膜を形成する方法として微小なノズルによる溶液の滴下法、すなわちインクジェット法を用いた。インクジェット法はノズルの圧電体に電気パルスを与え

ることで微小な液滴を噴射させる方法で電気パルスの数により半導体ウェハ表面に付着する酵素の量を精度良くコントロールすることができる(特願昭60-086924)。第1図に固定化酵素の製造プロセスを示した。まず、それぞれのゲート部1に酵素含有溶液、アルブミン溶液を滴下した(第1図(a))。ウレアーゼ固定化膜5には、2%ウレアーゼ、3%牛血清アルブミンを含有する0.02Mトリス緩衝液(pH8.5)を用いた。グルコースオキシターゼ固定化膜6には2%グルコースオキシターゼ、3%牛血清アルブミンを含有する0.02Mトリス緩衝液を、アルブミン膜には3%牛血清アルブミンを含有する0.02Mトリス緩衝液を用いた。なお、第1図(a)で2はサファイア基板、3は金、4はドレイン領域である。このウェハ8を一度乾燥させたもの(第1図(b))を25%グルタルアルデヒド水溶液11を入れた密閉容器9中の支持網10上にのせ、5分間放置した(第1図(c))。酵素膜はこの処理で不溶化する。酵素膜が厚い場合には、放置時間を長くするか、1%グルタルアルデヒド水溶液中に浸漬し、架橋反応をさらにすることもでき

る。膜を水洗して、未反応のグルタルアルデヒドを除去し、酵素電極を得た。第1図(d)で12, 13, 14, はそれぞれウレアーゼ固定化膜、アルブミン膜、グルコースオキシターゼ固定化膜である。この方法で得られた酵素電極の応答を第3図(a), (b)に示した。グルコースセンサはグルコースに应答するが、尿素の影響は見られない。逆に尿素センサは尿素にのみ应答している。このことから、この固定化方法ではそれぞれの酵素膜がきれいに分離されて製膜されていることがわかる。

(発明の効果)

本発明を適用するならば、酵素含有溶液のパターンを形成後簡単に架橋処理して固定化酵素膜を得ることができる。複数の種類の酵素膜を得る場合には複数の酵素の酵素含有溶液パターンを形成した後、一度に架橋処理することも可能である。また、酵素含有溶液パターンを形成、架橋処理という一連の操作をくり返すことで膜厚を変化させることも可能である。この方法では一度に滴下あるいは塗布する溶液は少量で良いため、パ

ターンの形成が容易になり、疎水性高分子膜を用いることなく酵素膜を精度良く形成することが可能である。

#### 図面の簡単な説明

第1図(a)~(d)は本発明による固定化酵素膜の製造方法の一実施例を示す図。第2図は実施例に示した酵素電極の上面図とセンサ部における断面図。第3図(a), (b)はセンサの応答を示す図。

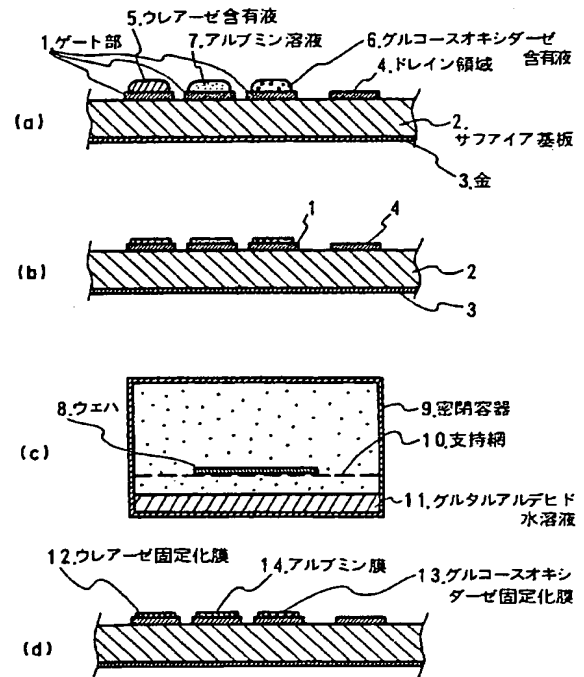
図において、

1…ISFETのゲート部、2…サファイア基板、3…金電極、4…ドレイン領域、5…ウレアーゼ含有溶液、6…グルコースオキシダーゼ含有溶液、7…アルブミン溶液、8…ウェハ、9…密封容器、10…支持網、11…グルタルアルデヒド水溶液、12…ウレアーゼ固定化膜、13…グルコースオキシダーゼ固定化膜、14…アルブミン膜、15…ソース領域、16…OUT1端子、17…OUT2端子、18…OUT3端子、19…共通ドレイン端子。

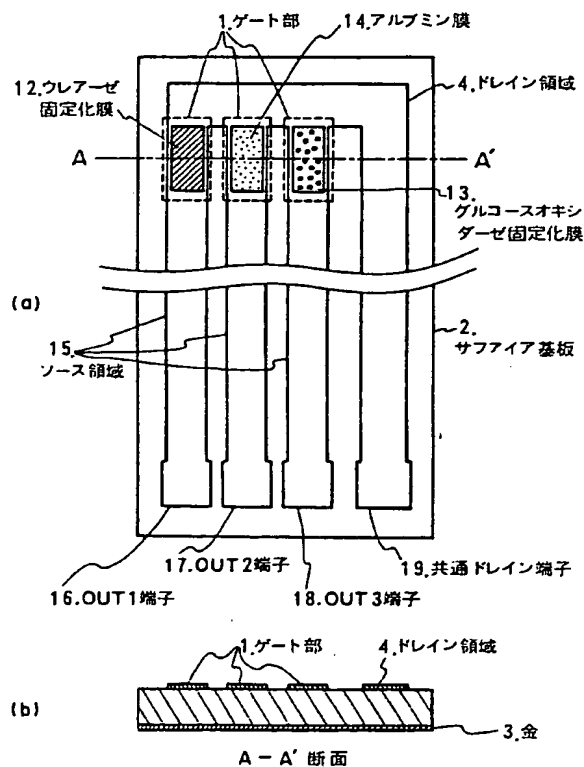
代理人 弁理士 内原



第 1 図



第 2 図



第 3 図

